BG Pulse Journal USA

ISSN:1947-2536 http://www.bgpulseusa.com/index.php/bg

ISOLATION OF KAEMFEROL FLAVONIDE FROM TUMOR PLANT USING CHROMATOGRAPHIC METHODS

Khudoykulova Sayyora Gaybullo qizi

Majidov Sardor Abdijalil ugli

Guliston State University

Email: sayyerkhudoyqulova1999@gmail.com

Phone: +998 50 199 98 76

Annotation

This study is devoted to the isolation of flavonoid kaempferol from raw materials of tumor plant using chromatographic methods and to evaluate the efficiency of the applied extraction and purification techniques. Flavonoids are important secondary metabolites of plants, which have significant biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer. Among them, kaempferol is a widely studied flavonol, which is distinguished by its promising pharmacological properties. Therefore, the development of effective methods for its isolation and purification from natural sources is of great scientific and practical importance. In this study, the plant raw material was extracted using ethanol, followed by liquid-liquid fractionation with solvents of different polarities to enrich flavonoid compounds. The ethyl acetate fraction, which was identified as the richest fraction in flavonoids, was subsequently processed using silica gel column chromatography. Thin-layer chromatography (TLC) was used to monitor the separation process and identify the fractions containing flavonoids, and final confirmation was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that the applied methodology allowed the successful isolation of kaempferol with high purity; this was confirmed by its characteristic retention time and chromatographic profile.

The results obtained indicate that the plant is a promising natural source of kaempferol and that chromatographic methods provide a reliable and reproducible approach for the isolation of flavonoids from plant matrices. The study also highlights the importance of selecting appropriate solvents and optimizing chromatographic conditions to achieve high yields and purity. Although the yield of the isolated substance was moderate, the achieved purity and analytical validation indicate that this method is suitable for further phytochemical studies. In addition, the results indicate that the study of natural products is of great importance for the development of the pharmaceutical and nutraceutical industries. The possibility of isolating biologically active compounds such as kaempferol expands the prospects for the use of plant sources in the development of drugs and functional food products. Future studies should focus on further optimizing the extraction parameters, using advanced chromatographic methods, and studying the biological activity of the extracted substance in more depth.

Keywords: Kaempferol; Flavonoids; Chromatography; Plant extraction; Thin layer chromatography (TLC); High performance liquid chromatography (HPLC); Plant extract; Phytochemistry; Natural products; Biologically active compounds

Kirish

Flavonoidlar o‘simliklarda keng tarqalgan polifenolik birikmalar sinfi bo‘lib, ular antioksidant, yallig‘lanishga qarshi, saratonga qarshi va yurak-qon tomir tizimini himoya qiluvchi kabi turli biologik faolliklari bilan ajralib turadi. Ular orasida kaempferol muhim flavonollardan biri bo‘lib, o‘zining sezilarli farmakologik xususiyatlari va terapevtik qo‘llanilish imkoniyatlari tufayli katta e’tibor qozongan. U ko‘plab dorivor o‘simliklar, meva va sabzavotlar tarkibida uchraydi hamda o‘simliklarning himoya mexanizmlarida muhim rol o‘ynaydi [1]. Flavonoidlar, jumladan kaempferolni o‘simlik manbalaridan ajratib olish va aniqlash ularning biologik funksiyalarini tushunish hamda farmatsevtik va nutratsevtik mahsulotlar yaratish uchun muhim ahamiyatga ega.O‘simlik ikkilamchi metabolitlarini ajratish va tozalashning eng samarali usullaridan biri xromatografiya hisoblanadi. Yupqa qatlamli xromatografiya (TLC), ustunli xromatografiya va yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) kabi usullar moddalarning qutbliligi, molekulyar massasi va harakatlanuvchi hamda statsionar fazalar bilan o‘zaro ta’sirlariga asoslangan holda ularni samarali ajratish imkonini beradi [2].

O‘sma (O‘sma) turkumiga mansub o‘simliklar (an’anaviy tibbiyotda keng qo‘llaniladi) tarkibida turli biologik faol birikmalar, jumladan flavonoidlar mavjudligi bilan mashhur. Biroq ushbu o‘simlikdan kaempferolni ajratib olish va xromatografik usullar bilan o‘rganish bo‘yicha batafsil tadqiqotlar yetarli emas. Shu sababli samarali ekstraksiya va tozalash usullarini o‘rganish uning farmakologiya va biotexnologiyadagi qo‘llanilish imkoniyatlarini kengaytirishda muhim ahamiyat kasb etadi [3].Flavonoidlarni xromatografik ajratish odatda erituvchilar yordamida ekstraksiya qilish va keyinchalik silika gel kabi mos statsionar fazalar yordamida fraksiyalashni o‘z ichiga oladi. Erituvchi tizimlarini to‘g‘ri tanlash va xromatografik sharoitlarni optimallashtirish maqsadli birikmaning yuqori tozaligi va hosildorligini ta’minlashda hal qiluvchi ahamiyatga ega. HPLC kabi zamonaviy analitik usullar esa ajratib olingan birikmalarni aniq aniqlash va miqdoriy baholash imkonini beradi [4].

Ushbu tadqiqotning maqsadi o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferol flavonoidini xromatografik usullar yordamida ajratib olish va ekstraksiya hamda tozalash jarayonining samaradorligini baholashdan iborat. Tadqiqot natijalari biologik faol birikmalarni ajratishning takomillashtirilgan usullarini ishlab chiqishga hissa qo‘shishi hamda kaempferolning farmatsevtik va biomedikal sohalarda qo‘llanilish istiqbollarini qo‘llab-quvvatlashi mumkin [5].

Usullar

Ushbu tadqiqot o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferol flavonoidini xromatografik usullar yordamida ajratib olishga qaratildi. Tajriba jarayoni o‘simlik xom ashyosini tayyorlash, erituvchi yordamida ekstraksiya qilish, xromatografik ajratish va birikmani aniqlash bosqichlaridan iborat bo‘ldi.

O‘sma o‘simligining yangi yer ustki qismlari yig‘ib olindi, yuvildi va biologik faol moddalarni saqlab qolish maqsadida soyada, xona haroratida quritildi. Quritilgan material laboratoriya maydalagich yordamida mayda kukunga aylantirildi. Taxminan 100 g o‘simlik kukuni 70% li etanol yordamida ekstraksiya qilindi, chunki bu erituvchi polifenolik birikmalarni samarali ajratib olish xususiyatiga ega. Ekstraksiya jarayoni 48 soat davomida vaqti-vaqti bilan aralashtirib turilgan holda makeratsiya usulida amalga oshirildi, so‘ngra filtratsiya qilindi. Olingan ekstrakt rotatsion bug‘latkich yordamida past bosim ostida konsentratsiyalandi va xom ekstrakt olindi [1].Xom ekstrakt keyinchalik turli qutblilikka ega erituvchilar (geksan, xloroform va etilatsetat) yordamida suyuqlik–suyuqlik fraksiyalash orqali ajratildi. Flavonoidlarga boyligi bilan ajralib turadigan etilatsetat fraksiyasi keyingi xromatografik tahlil uchun tanlab olindi.

Ustunli xromatografiya silika gelni statsionar faza sifatida qo‘llagan holda amalga oshirildi. Tanlangan fraksiya ustunga yuklandi va eluatsiya xloroform va metanol aralashmasidan iborat bo‘lgan, qutbliligi bosqichma-bosqich oshib boruvchi gradient erituvchi tizimi yordamida bajarildi. Fraksiyalar ketma-ket yig‘ildi va yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) yordamida nazorat qilindi. TLC tahlili silika gel plastinkalarda o‘tkazildi, dog‘lar ultrabinafsha (UV) nuri ostida (254 nm va 366 nm) hamda flavonoidlarni aniqlashni kuchaytiruvchi alyuminiy xlorid kabi reagentlar bilan ishlov berish orqali vizuallashtirildi [2].TLC natijalari o‘xshash bo‘lgan fraksiyalar birlashtirildi va qo‘shimcha tozalash jarayonidan o‘tkazildi. Tozalangan birikma yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) yordamida tahlil qilinib, kaempferol mavjudligi tasdiqlandi. Aniqlash standart kaempferol bilan saqlanish vaqti (retention time)ni taqqoslash va UV-spektral xususiyatlariga asoslangan holda amalga oshirildi [3].Qo‘llanilgan metodologiya o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferolni samarali ekstraksiya qilish, ajratish va aniqlash imkonini berdi. Barcha tajribalar natijalarning takrorlanishi va aniqligini ta’minlash maqsadida nazorat ostidagi laboratoriya sharoitida bajarildi [4].

Natijalar

Qo‘llanilgan ekstraksiya va xromatografik usullar o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferol flavonoidini muvaffaqiyatli ajratib olish va aniqlash imkonini berdi. Natijalar shuni ko‘rsatdiki, etanol yordamida ekstraksiya qilish, erituvchilar bilan fraksiyalash va silika gel ustunli xromatografiyani birgalikda qo‘llash keyingi tahlillar uchun mos darajada tozalangan flavonoid fraksiyasini olishda samarali bo‘ldi.Dastlabki etanol ekstraksiyasi natijasida quritilgan o‘simlik massasining taxminan 12,5% ga teng bo‘lgan to‘q yashil rangli xom ekstrakt olindi. Keyingi suyuqlik–suyuqlik fraksiyalash natijalari etilatsetat fraksiyasi fenolik birikmalar, jumladan flavonoidlarning eng yuqori konsentratsiyasiga ega ekanini ko‘rsatdi. Ushbu fraksiya dastlabki skrining jarayonida kuchli UV yutilish xususiyatini namoyon etdi va flavonoidlarga xos reagentlar bilan ijobiy reaksiya berdi, bu esa uning xromatografik ajratish uchun mosligini tasdiqladi [1].

Yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) tahlili etilatsetat fraksiyasida UV nuri ostida bir nechta aniq dog‘lar mavjudligini ko‘rsatdi, bu esa bir nechta flavonoid birikmalar borligini bildiradi. Ustunli xromatografiyadan so‘ng xloroform:metanol (9:1 dan 7:3 gacha) tizimida elyutsiya qilingan fraksiyalarda taxminan 0,52 Rf qiymatga ega bo‘lgan yorqin sariq floresans dog‘ kuzatildi, bu standart kaempferolga mos keladi. Alyuminiy xlorid reaktivi bilan ishlov berilganda floresans kuchayib, ajratib olingan moddaning flavonoid tabiatini yana bir bor tasdiqladi [2].TLC natijalari o‘xshash bo‘lgan fraksiyalar birlashtirilib, qo‘shimcha tozalashdan o‘tkazildi va natijada sariq

kristall modda ajratib olindi. Tozalangan moddaning chiqimi xom ekstraktga nisbatan taxminan 1,8% ni tashkil etdi. Ushbu modda metanol va etanolda yaxshi eruvchanlikni namoyon etdi hamda flavonollarga xos UV yutilish maksimumlariga ega bo‘ldi.

Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) tahlili ajratib olingan moddaning kaempferol ekanini tasdiqladi. Xromatogrammada 5,8 daqiqa saqlanish vaqtiga ega bo‘lgan yagona asosiy pik kuzatildi, bu standart kaempferol bilan mos keladi. Ajratib olingan moddaning tozaligi 95% dan yuqori deb baholandi, bu esa xromatografik tozalash jarayonining yuqori samaradorligini ko‘rsatadi [3].

Miqdoriy va taqqoslama natijalar

Ko‘rsatkich	Natija	Izoh
Xom ekstrakt chiqimi	12,5%	O‘simlik metabolitlari samarali ajratib olingan
Etilatsetat fraksiyasi chiqimi	4,2%	Flavonoidlarga boy fraksiya
Kaempferol chiqimi	1,8% (xom ekstraktdan)	O‘rtacha ajratish samaradorligi
TLC Rf qiymati	0,52	Standart kaempferolga mos
HPLC saqlanish vaqti	5,8 daqiqa	Standart bilan mos
Tozalik (HPLC)	>95%	Yuqori tozalik darajasi

Natijalar shuni ko‘rsatadiki, o‘sma o‘simligi kaempferolning istiqbolli tabiiy manbai hisoblanadi. Ushbu tadqiqotda qo‘llanilgan xromatografik usul flavonoidlarni ajratib olishda ishonchli, takrorlanadigan va samarali ekanini namoyon etdi. TLC va HPLC usullarining birgalikda qo‘llanilishi ajratib olingan moddaning aniq identifikatsiyasi va yuqori tozaligini ta’minladi.

Bundan tashqari, olingan ma’lumotlar erituvchi tizimlari va xromatografik sharoitlarni optimallashtirish orqali kaempferolning chiqimi va tozaligini yanada oshirish mumkinligini ko‘rsatadi. Ushbu natijalar o‘sma o‘simligidan olingan kaempferolni farmatsevtika va nutratsevtika sanoatida qo‘llash istiqbollarini qo‘llab-quvvatlaydi [4].

Muhokama

Ushbu tadqiqot natijalari xromatografik usullar o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferolni ajratib olishda yuqori samaradorlikka ega ekanini ko‘rsatdi va bu o‘simlikning biologik faol flavonoidlar uchun muhim tabiiy manba ekanligini tasdiqladi. Etanol yordamida olingan xom ekstraktning nisbatan yuqori chiqimi qutbli erituvchilar fenolik birikmalarni, jumladan flavonoidlarni ajratib olish uchun mos ekanini ko‘rsatadi. Bu natijalar avvalgi tadqiqotlar bilan mos

keladi, chunki gidroalkogolli erituvchilar polifenollarni o‘simlik matritsasidan samarali ajratib olishga yordam berishi isbotlangan [1].Qutbliligi ortib boruvchi erituvchilar yordamida amalga oshirilgan fraksiyalash bosqichi flavonoidlarni etilatsetat fraksiyasida to‘plashda muhim rol o‘ynadi. Ushbu fraksiyada flavonoidlarning boyishi kaempferol kabi flavonollarning o‘rtacha qutblilik xususiyatiga ega ekanligi bilan izohlanadi. Bu bosqich ekstrakt tarkibini soddalashtirib, keyingi xromatografik ajratish samaradorligini oshirdi. Bunday erituvchi bilan fraksiyalash fitokimyoviy tahlilning muhim bosqichlaridan biri sifatida keng qo‘llaniladi [2].

Yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) ajratish jarayonini kuzatish va flavonoidlarni o‘z ichiga olgan fraksiyalarni aniqlashda tez va ishonchli usul sifatida o‘zini ko‘rsatdi. UV nuri ostida kuzatilgan xos floresans dog‘ hamda alyuminiy xlorid reaktivi bilan ishlov berilgandan keyin uning yanada aniq ko‘rinishi flavonoidlarning mavjudligini tasdiqladi. Ushbu tadqiqotda aniqlangan Rf qiymati standart kaempferolga mos kelib, dastlabki identifikatsiyaning to‘g‘riligini ko‘rsatdi. Shu sababli TLC ustunli xromatografiya davomida fraksiyalarni tanlashda samarali sifat tahlil usuli bo‘lib xizmat qildi [3].Silika gel asosidagi ustunli xromatografiya maqsadli birikmani muvaffaqiyatli ajratib olish imkonini berdi. Gradient erituvchi tizimidan foydalanish moddalarning qutbliligiga qarab samarali ajralishini ta’minladi. Erituvchi qutbliligining bosqichma-bosqich oshirilishi kaempferolning ma’lum fraksiyalarda ajralib chiqishiga yordam berdi va boshqa birikmalar bilan aralashishni kamaytirdi. Ajratib olingan moddaning yuqori tozaligi (>95%) tanlangan xromatografik sharoitlar to‘g‘ri va samarali bo‘lganini ko‘rsatadi. Bu esa silika gel xromatografiyasining o‘simlik flavonoidlarini tozalashda ishonchli standart usul ekanini yana bir bor tasdiqlaydi [4].

Yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) ajratib olingan moddaning tarkibi va tozaligini yakuniy tasdiqlash imkonini berdi. Namunadagi saqlanish vaqtining standart kaempferol bilan mos kelishi va xromatogrammada bitta asosiy pikning mavjudligi ajratish jarayonining samaradorligini tasdiqlaydi. HPLC tahlili nafaqat birikmaning identifikatsiyasini, balki qo‘llanilgan metodikaning aniqligi va takrorlanishini ham ko‘rsatdi. Bu klassik xromatografik usullarni zamonaviy analitik metodlar bilan birlashtirish fitokimyoviy tadqiqotlarda muhim ahamiyatga ega ekanini ko‘rsatadi [5].

Shunga qaramay, kaempferol muvaffaqiyatli ajratib olingan bo‘lsa-da, uning umumiy chiqimi o‘rtacha darajada bo‘lib qoldi. Bu esa ekstraksiya va tozalash sharoitlarini yanada optimallashtirish zarurligini bildiradi. Erituvchi tarkibi, ekstraksiya vaqti, harorat hamda ustun parametrlarini o‘zgartirish orqali samaradorlikni oshirish mumkin. Bundan tashqari, preparativ HPLC yoki yuqori tezlikdagi qarama-qarshi oqimli xromatografiya (HSCCC) kabi ilg‘or usullar kelgusida chiqim va tozalikni yanada yaxshilashi mumkin [6].Kengroq nuqtai nazardan qaraganda, ushbu tadqiqot natijalari kaempferolning farmatsevtik va nutratsevtik sohalarda qo‘llanilishi uchun muhim ahamiyatga ega. Uning antioksidant, yallig‘lanishga qarshi va saratonga qarshi xususiyatlari yaxshi o‘rganilgan bo‘lib, uni o‘simlik manbalaridan samarali ajratib olish imkoniyati dori vositalari yaratish va funksional oziq-ovqat ishlab chiqarish istiqbollarini kengaytiradi. Shuningdek, o‘sma o‘simligining kaempferol manbai sifatida aniqlanishi mahalliy dorivor o‘simliklarni chuqurroq o‘rganish imkonini beradi [7].

Xulosa qilib aytganda, ushbu tadqiqot xromatografik usullar to‘g‘ri optimallashtirilganda o‘simliklardan flavonoidlarni, xususan kaempferolni samarali ajratib olish imkonini berishini

tasdiqlaydi. Ekstraksiya, fraksiyalash va analitik usullarni birgalikda qo‘llash yuqori samaradorlik va aniqlikni ta’minlaydi hamda tabiiy birikmalarni biotibbiyot sohalarida qo‘llash uchun yangi imkoniyatlar yaratadi.

Xulosa

Xulosa qilib aytganda, ushbu tadqiqot o‘sma o‘simligi xom ashyosidan kaempferolni xromatografik usullar yordamida samarali ajratib olish mumkinligini ko‘rsatdi. Etanol yordamida ekstraksiya, erituvchilar bilan fraksiyalash va silika gel ustunli xromatografiyani birgalikda qo‘llash nisbatan toza flavonoid fraksiyasini olishda ishonchli usul ekanligi aniqlandi. Yupqa qatlamli xromatografiya (TLC) yordamida nazorat qilish va yuqori samarali suyuqlik xromatografiyasi (HPLC) orqali yakuniy aniqlash ajratib olingan moddaning aniqligi va yuqori tozaligini ta’minladi [1].Natijalar o‘sma o‘simligi kaempferolning istiqbolli tabiiy manbai ekanini tasdiqlaydi. Olingan yuqori tozalik darajasi va barqaror analitik natijalar qo‘llanilgan metodikaning fitokimyoviy tadqiqotlar uchun mosligini hamda boshqa o‘simlik birikmalarini ajratishda ham qo‘llash mumkinligini ko‘rsatadi [2].

Biroq kaempferolning o‘rtacha chiqimi ekstraksiya va xromatografik sharoitlarni yanada takomillashtirish zarurligini bildiradi. Kelgusidagi tadqiqotlar erituvchi tizimlarini optimallashtirish, zamonaviy tozalash usullarini qo‘llash hamda ajratib olingan moddaning biologik faolligini chuqurroq o‘rganishga qaratilishi lozim [3].

Umuman olganda, ushbu tadqiqot tabiiy mahsulotlar kimyosida xromatografik usullarning ahamiyatini yana bir bor ko‘rsatadi va o‘simlikdan olingan flavonoidlarning farmatsevtika hamda nutratsevtika sohalarida qo‘llanilish istiqbollarini qo‘llab-quvvatlaydi. Natijalar o‘sma o‘simligi tarkibini ilmiy jihatdan kengroq o‘rganish va amaliy qo‘llash uchun asos bo‘lib xizmat qiladi [4].

Foydalanilgan adabiyotlar:

1. Harborne, J. B. (1998). *Fitokimyoviy usullar: o‘simliklarni tahlil qilishning zamonaviy texnikalari bo‘yicha qo‘llanma* (3-nashr). Chapman & Hall.
2. Markham, K. R. (1982). *Flavonoidlarni aniqlash usullari*. Academic Press.
3. Mabry, T. J., Markham, K. R., & Thomas, M. B. (1970). *Flavonoidlarni tizimli aniqlash*. Springer-Verlag.
4. Dewick, P. M. (2009). *Dorivor tabiiy mahsulotlar: biosintetik yondashuv* (3-nashr). Wiley.
5. Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). O‘simlik fenollari: ekstraksiya, tahlil va ularning antioksidant hamda saratonga qarshi xususiyatlari. *Molecules*, 15(10), 7313–7352. https://doi.org/10.3390/molecules15107313
6. Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Oziq-ovqat fenollari: kimyosi, biologik o‘zlashtirilishi va sog‘liqqa ta’siri. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001–1043. https://doi.org/10.1039/B802662A
7. Justesen, U. (2000). Yangi o‘simlik ekstraktlaridagi flavonoidlarni tavsiflash uchun manfiy atmosfera bosimida kimyoviy ionlanish va past energiyali kollizion aktivatsiyali massa-spektrometriya. *Journal of Chromatography A*, 902(2), 369–379. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00946-6
8. Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). Meva va sabzavotlardagi polifenolik birikmalarni tavsiflash usullariga tanqidiy sharh. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026